

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



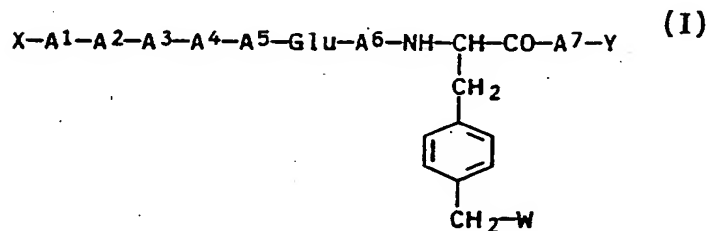
PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> :  C07K 7/06 // A61K 37/64		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/13879 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. August 1992 (20.08.92)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP91/02191 (22) Internationales Anmeldedatum: 21. November 1991 (21.11.91)  (30) Prioritätsdaten: P 41 03 649.2 7. Februar 1991 (07.02.91) DE  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : SCHMIED, Bernhard [DE/DE]; Taunusstrasse 20, D-6710 Frankenthal (DE). HOEFFKEN, Hans, Wolfgang [DE/DE]; Dammstueckerweg 101, D-6700 Ludwigshafen (DE). HORNBERGER, Wilfried [DE/DE]; Mundenheimer Strasse 152, D-6700 Ludwigshafen (DE). BERNARD, Harald [DE/DE]; Valentin-Ostertag-Strasse 2, D-6702 Bad Duerkheim (DE).		(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE).  (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	

(54) Title: NOVEL PEPTIDES WITH ANTICOAGULATORY EFFECT

(54) Bezeichnung: NEUE ANTIKOAGULATORISCH WIRKSAME PEPTIDE



## (57) Abstract

The description relates to peptides of the formula (I), in which X, A<sup>1</sup>-A<sup>7</sup>, Y and W have the meanings given in the description, and their production. The peptides are suitable for combatting diseases.

## (57) Zusammenfassung

Es werden Peptide der Formel (I), worin X, A<sup>1</sup>-A<sup>7</sup>, Y und W die in der Beschreibung angegebene Bedeutung besitzen, sowie deren Herstellung beschrieben. Die Peptide eignen sich zur Bekämpfung von Krankheiten.

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT Österreich  
 AU Australien  
 BB Barbados  
 BE Belgien  
 BF Burkina Faso  
 BG Bulgarien  
 BJ Benin  
 BR Brasilien  
 CA Kanada  
 CF Zentrale Afrikanische Republik  
 CG Kongo  
 CH Schweiz  
 CI Côte d'Ivoire  
 CM Kamerun  
 CS Tschechoslowakei  
 DE\* Deutschland  
 DK Dänemark  
 ES Spanien

FI Finnland  
 FR Frankreich  
 GA Gabon  
 GB Vereinigtes Königreich  
 GN Guinea  
 GR Griechenland  
 HU Ungarn  
 IE Irland  
 IT Italien  
 JP Japan  
 KP Demokratische Volksrepublik Korea  
 KR Republik Korea  
 LI Liechtenstein  
 LK Sri Lanka  
 LU Luxemburg  
 MC Monaco  
 MG Madagaskar  
 ML Mali

MN Mongolei  
 MR Mauritien  
 MW Malawi  
 NL Niederlande  
 NO Norwegen  
 PL Polen  
 RO Rumänien  
 RU Russische Föderation  
 SD Sudan  
 SE Schweden  
 SN Senegal  
 SU Soviet Union  
 TD Tschad  
 TG Togo  
 US Vereinigte Staaten von Amerika

## Neue antikoagulatorisch wirksame Peptide

### Beschreibung

- 5 Hirudin ist ein Naturstoff mit blutgerinnungshemmenden Eigenschaften, der in den Speicheldrüsen des Blutegels *Hirudo medicinalis* gebildet wird. Hirudin liegt als Gemisch aus Polypeptiden mit 64 bis 66 Aminosäuren vor. Hauptbestandteil dieses Gemisches ist ein Polypeptid mit 65 Aminosäuren, das an
- 10 Tyrosin-63 einen O-Sulfatrest trägt:

Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-  
Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-  
Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-  
15 Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gly-Cys-Val-  
Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-  
His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-  
Glu-Glu-Tyr(SO<sub>3</sub>H)-Leu-Gln

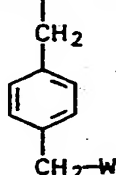
- 20 Hirudin bindet sehr stark und mit hoher Spezifität an Thrombin, das Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade. Der Thrombin-Hirudin-Komplex ist nicht mehr zur Spaltung von Fibrinogen, dem natürlichen Substrat von Thrombin, befähigt.
- 25 Die antikoagulatorische Wirkung läßt Hirudin als potentiell Pharmakon erscheinen. Allerdings kann natürliches (O-sulfatiertes) Hirudin nur sehr mühsam und in sehr geringen Ausbeuten aus Blutegeln isoliert werden. Rekombinantes Hirudin enthält keinen sulfatierten Tyrosinrest und besitzt eine deutlich schlechtere
- 30 Bindungskonstante gegenüber Thrombin.

- Hirudin, das für medizinische Anwendungen bestimmt ist und das aus zellulärem Material isoliert wurde, muß mit besonderer Sorgfalt gereinigt werden. Rest-DNA, Fremdproteine, Toxine oder
- 35 virale Kontaminationen sind unter allen Umständen auszuschließen. Darüberhinaus ist eine reproduzierbare perorale oder transdermale Applikation für ein Polypeptid dieser Größe, selbst unter Anwendung galenischer Hilfsmittel, kaum vorstellbar.
- 40 Aus den genannten Gründen wurde schon frühzeitig versucht aus der Hirudin-Sequenz Oligopeptide abzuleiten, die ebenfalls über antikoagulatorische Eigenschaften verfügen, aber vollsynthetisch und damit preisgünstig und in hoher Reinheit herzustellen sind.

Viele dieser literaturbekannten Peptide weisen tatsächlich thrombininhibierende Eigenschaften auf (J.Med.Chem. 31, 1009 (1988); EP 291981). Allerdings fällt die Wirkstärke dieser Verbindungen mit abnehmender Kettenlänge stark ab. Die EC<sub>100</sub> des C-terminalen Dekapeptids Hirudin<sub>56-65</sub> liegt etwa 2000mal höher als die des Hirudins.

Es wurde nun gefunden, daß bei geeigneter Substitution die thrombininhibierende Wirkung kurzer Peptide, die sich vom C-Terminus des Hirudin ableiten, dieselbe Größenordnung der Wirkstärke wie Hirudin erreichen können.

Gegenstand der Erfindung sind Peptide der Formel I:



I,

15 worin

X H, Acetyl, Succinyl, Maleoyl, Phthaloyl oder Fumaryl,

A<sub>1</sub> Phe, Tyr oder Cha,

20

A<sub>2</sub> Glu oder D-Glu,

A<sub>3</sub> Glu, Pro oder Hyp,

25 A<sub>4</sub> Ile, Leu, Val oder Cha,

A<sub>5</sub> Pro oder Hyp,

A<sub>6</sub> Glu oder D-Glu,

30

A<sub>7</sub> Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Cha oder D-Cha,

Y OH, Gln-OH, Gln-NH<sub>2</sub>, D-Gln-OH, D-Gln-NH<sub>2</sub>, Glu-OH, Glu-NH<sub>2</sub>,  
D-Glu-OH oder D-Glu-NH<sub>2</sub> und

35

W für einen der Reste  $\text{SO}_3\text{H}$  oder  $\text{PO}_3\text{H}_2$  stehen,

sowie deren Salze mit physiologisch verträglichen Basen oder Säuren.

5

Zur Abkürzung der Aminosäuren wurde der übliche Dreibuchstaben-Code benutzt, Cha ist Cyclohexylalanin und Hyp ist trans-4-Hydroxyprolin. Falls nicht anders spezifiziert, liegen die Aminosäuren in der L-Konfiguration vor. Die vom Phenylalanin  
10 abgeleiteten unnatürlichen Aminosäuren mit den Resten W können sowohl in der L- als auch in der D-Konfiguration vorliegen.

In der Formel I bedeuten X vorzugsweise Succinyl, A<sup>1</sup> vorzugsweise Tyr, A<sup>2</sup> vorzugsweise Glu, A<sup>3</sup> vorzugsweise Pro oder Hyp, A<sup>4</sup> vor-  
15 zugsweise Ile, Val oder Cha, A<sup>5</sup> vorzugsweise Hyp, A<sup>6</sup> vorzugsweise Glu, A<sup>7</sup> vorzugsweise Leu, Ile oder Cha und Y vorzugsweise OH, Gln-OH, D-Gln-OH, Glu-OH oder D-Glu-OH.

Als physiologisch verträgliche Säuren sind insbesondere zu  
20 nennen: Salzsäure, Zitronensäure, Weinsäure, Milchsäure, Phosphorsäure, Methansulfonsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Apfelsäure, Bernsteinsäure, Malonsäure, Schwefelsäure, L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, Brenztraubensäure, Schleimsäure, Benzoessäure, Glucuronsäure, Oxalsäure,  
25 Ascorbinsäure, Acetylglycin.

Als physiologisch verträgliche Basen kommen Hydroxide und Hydrogencarbonate folgender Substanzen in Betracht: Aluminium,  
30 Calcium, Kalium, Lithium, Magnesium, Natrium, Diethanolamin, Ethylendiamin und Meglumin.

Die neuen Verbindungen lassen sich nach in der Peptidchemie bekannten Methoden herstellen.

35 So kann man die Peptide sequentiell aus Aminosäuren oder durch Fragmentverknüpfung geeigneter Peptide aufbauen. Beim sequentiellen Aufbau wird die Peptidkette beginnend am C-Terminus stufenweise um jeweils eine Aminosäure verlängert. Bei der Fragmentkupplung können Fragmente unterschiedlicher Länge mit-  
40 einander verknüpft werden, wobei die Fragmente wiederum durch sequentiellen Aufbau aus Aminosäuren oder ihrerseits durch Fragmentkupplung gewonnen werden können:

Sowohl beim sequentiellen Aufbau, als auch bei der Fragmentkuppelung müssen die Bausteine durch Bildung einer Amidbindung verknüpft werden. Hierzu eignen sich enzymatische und chemische Methoden.

- 5 Chemische Methoden zur Amidbindungsbildung sind ausführlich behandelt bei Müller, Methoden der Organischen Chemie Vol XV/2, pp 1-364, Thieme Verlag, Stuttgart, 1974; Stewart, Young, Solid  
10 Phase Peptide Synthesis, pp 31-34, 71-82, Pierce Chemical Company, Rockford, 1984; Bodanszky, Klausner, Ondetti, Peptide Synthesis, pp 85-128, John Wiley & Sons, New York, 1976 und anderen Standardwerken der Peptidchemie. Besonders bevorzugt sind die Azidmethode, die symmetrische und gemischte Anhydridmethode,  
15 in situ erzeugte oder präformierte Aktivester und die Amidbindungsbildung mit Hilfe von Kupplungsreagenzien (Aktivatoren), insbesondere Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Diisopropylcarbodiimid (DIC), 1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (EEDQ), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid (EDCI),  
20 n-Propanphosphonsäureanhydrid (PPA), N,N-Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)amidophosphorsäurechlorid (BOP-Cl), Diphenylphosphorylazid (DPPA), Castro's Reagenz (BOP), 2(1H-Benzotriazol-(1)-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-Salze (HBTU), 2,5-Diphenyl-2,3-dihydro-3-oxo-4-hydroxythiophendioxid (Steglich's Reagenz; HOTDO) und 1,1'-Carbonyl-diimidazol (CDI). Die Kupplungsreagenzien  
25 können allein oder in Kombination mit Additiven wie N,N'-Dimethyl-4-aminopyridin (DMAP), N-Hydroxybenzotriazol (HOBT), N-Hydroxybenzotriazin (HOObt), N-Hydroxysuccinimid (HOSu) oder 2-Hydroxypyridin eingesetzt werden.

- 30 Während bei der enzymatischen Peptidsynthese normalerweise auf Schutzgruppen verzichtet werden kann, ist für die chemische Synthese ein reversibler Schutz der an der Bildung der Amidbindung nicht beteiligten reaktiven funktionellen Gruppen der beiden Reaktionspartner erforderlich. Bei den anspruchsgemäßen  
35 Verbindungen der Formel I kommt dem derivatisierten N-Terminus zusätzlich eine, die Wirkstärke modulierende, Bedeutung zu.

- Bei den chemischen Peptidsynthesen werden drei literaturbekannte Schutzgruppentechniken bevorzugt: Die Benzyloxycarbonyl(Z)-, die  
40 t-Butyloxycarbonyl(Boc)- und die 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-(Fmoc)-Schutzgruppentechnik. Bezeichnet ist jeweils die Schutz-

gruppe der  $\alpha$ -Aminofunktion des kettenverlängernden Bausteines. Die Seitenkettenschutzgruppen der trifunktionellen Aminosäuren werden so gewählt, daß sie nicht notwendigerweise zusammen mit der  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe abgespalten werden. Eine ausführliche  
5 Übersicht über Aminosäureschutzgruppen geben Müller, Methoden der Organischen Chemie Vol XV/1, pp 20-906, Thieme Verlag, Stuttgart, 1974 und Bodanszky, The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlin 1984. Die Bausteine, die dem Aufbau der Peptid-  
10 kette dienen, können in Lösung, in Suspension oder nach einem ähnlichen Verfahren, wie es von Merrifield in J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149, 1963 beschrieben ist, zur Reaktion gebracht werden. Besonders bevorzugt sind Verfahren, bei denen Peptide sequentiell  
15 oder durch Fragmentkupplung unter Verwendung der Z-, Boc- oder Fmoc-Schutzgruppentechnik aufgebaut werden, wobei die Reaktionspartner in Lösung zur Reaktion gebracht werden, sowie Verfahren, bei denen, ähnlich der genannten Merrifield-Technik, ein Reaktionspartner an einen unlöslichen polymeren Träger (im folgenden  
auch Harz genannt) gebunden zur Reaktion gebracht wird. Dabei wird das Peptid typischerweise unter Verwendung der Boc- oder  
20 Fmoc-Schutzgruppentechnik sequentiell am polymeren Träger aufgebaut, wobei die wachsende Peptidkette am C-Terminus kovalent mit den unlöslichen Harzteilen verbunden ist. Diese Arbeitsweise erlaubt es, Reagentien und Nebenprodukte durch Filtration zu entfernen, die Umkristallisation von Zwischenprodukten wird  
25 somit überflüssig.

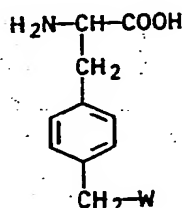
Die geschützten Aminosäuren können an beliebige geeignete Polymerisate gebunden werden, die lediglich in den verwendeten  
Lösungsmitteln unlöslich sein und eine beständige physikalische  
30 Form, die leichte Filtration ermöglicht, aufweisen müssen. Das Polymerisat muß eine funktionelle Gruppe enthalten, an die die erste geschützte Aminosäure durch eine kovalente Bindung fest gebunden werden kann. Für diesen Zweck eignen sich die verschiedensten Polymerisate, z.B. Cellulose, Polyvinylalkohol,  
35 Polymethacrylat, sulfoniertes Polystyrol, chlormethyliertes Copolymerisat von Styrol und Divinylbenzol (Merrifield-Harz), 4-Methylbenzhydrylamin-Harz (MBHA-Harz), Phenylacetamidomethyl-Harz (Pam-Harz), p-Benzoyloxybenzylalkohol-Harz, Benzhydrylamin-Harz (BHA-Harz), 4-(Hydroxymethyl)-benzoyloxymethyl-Harz, Harz  
40 nach Breipohl et al. (Tetrahedron Lett. 28, 565, 1987; Fa. BACHEM), HYCRAM-Harz (Fa. ORPEGEN) oder SASRIN-Harz (Fa. BACHEM).



Für die Peptidsynthese in Lösung eignen sich alle Lösungsmittel, die sich unter den Reaktionsbedingungen als inert erweisen, insbesondere Wasser, N,N'-Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO), Acetonitril, Dichlormethan (DCM), 1,4-Dioxan, Tetrahydrofuran (THF), N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) sowie Gemische der genannten Lösungsmittel. Die Peptidsynthese am polymeren Träger kann in allen inerten organischen Lösungsmitteln, in denen die verwendeten Aminosäurederivate löslich sind, durchgeführt werden; bevorzugt sind jedoch Lösungsmittel, die zusätzlich harzquellende Eigenschaften besitzen, wie DMF, DCM, NMP, Acetonitril und DMSO, sowie Gemische dieser Lösungsmittel.

Nach erfolgreicher Synthese wird das Peptid vom polymeren Träger abgespalten. Die Bedingungen, unter denen sich die verschiedenen Harztypen abspalten lassen, sind literaturbekannt. Am häufigsten finden saure und Palladium-katalysierte Spaltreaktionen Anwendung, insbesondere die Spaltung in flüssigem wasserfreiem Fluorwasserstoff, in wasserfreier Trifluormethansulfonsäure, in verdünnter oder konzentrierter Trifluoressigsäure oder die Palladium-katalysierte Spaltung in THF oder THF-DCM-Gemischen in Anwesenheit einer schwachen Base wie z.B. Morpholin. Je nach Wahl der Schutzgruppen können diese unter den Spaltbedingungen erhalten bleiben oder ebenfalls abgespalten werden. Auch eine teilweise Entschützung des Peptids kann sinnvoll sein, oder die postsynthetische Derivatisierung des bei der Spaltung freigesetzten N-Terminus, wenn die Eigenschaften der Verbindungen dadurch günstig beeinflusst werden.

Alle für die Peptidsynthese verwendeten Bausteine sind kommerziell verfügbar, mit Ausnahme der Aminosäuren der Formel II (worin W die in Formel I angegebene Bedeutung besitzt)



II,

die über die Acetamidomalonester-Synthese oder andere literaturbekannte Methoden (E. Müller, Methoden der organischen Chemie, Bd XI/2; 1958) zur Darstellung von Aminosäuren zugänglich sind.

In Abhängigkeit von den Edukten und den Reaktionsbedingungen fallen die Aminosäuren der Formel II entweder mit definierter Stereochemie oder racemisch an. Die racemischen Aminosäuren der Formel II lassen sich nach literaturbekannten Methoden in ihre Antipoden trennen oder die Racemate werden in die Peptidsynthese eingesetzt und die resultierenden diastereomeren Peptidgemische getrennt.

Die biologische Charakterisierung der neuen Peptide als Thrombin-Inhibitoren erfolgte in folgenden Testsystemen:

1. Thrombinzeit (TT) in vitro

Zur Gewinnung von Citratplasma wird humanes Blut durch Venenpunktion am Arm entnommen, mit Natriumcitrat (0,11 mol/l) gemischt (9 Teile Blut + 1 Teil Natriumcitrat) und anschließend 10 min bei 1600 xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zu 50 µl der Substanzlösung bzw. Lösungsmittel werden 50 µl Citratplasma gegeben und 2 min bei 37°C inkubiert. Danach werden 100 µl auf 37°C temperiertes Thrombin-Reagenz (Boehringer Mannheim) zupipettiert und die Zeit bis zum Eintritt der Gerinnung in einem photometrischen Koagulatometer gemessen.

Als Maß der relativen Wirksamkeit wird als EC<sub>100</sub> die Konzentration einer Prüfsubstanz in mol/l berechnet, die die Plasma-Thrombinzeit um 100 % verlängert.

Die Plasma-Thrombinzeit erfaßt die Thrombin-induzierte Fibrinbildung aus Fibrinogen und die Fibrinaggregation, d.h. den letzten Schritt der Gerinnung.

2. Amidolytische Bestimmung der Aktivität von Thrombin (analog auch von anderen Serinproteasen: Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Faktor Xa, aktives Protein C)

Testprinzip:

chromogenes Substrat  $\xrightarrow{\text{Serinprotease}}$  Peptid + p-Nitroanilin (gelb)

In Mikroplatten werden jeweils 250  $\mu$ l Thrombin (0,124 IU/ml, EK 0,1 IU/ml) in Tris-Puffer (Tris 50 mmol/l, NaCl 154 mmol/l, pH 8,0) vorgelegt. Diese Lösung wird mit 10  $\mu$ l Lösungsmittel (Kontrolle) bzw. Prüfsubstanz versetzt, 1 min gemischt und 4 min bei 25°C inkubiert. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ l Substratlösung (S-2238, 0,62 mmol/l, EK 0,1 mmol/l) gestartet und nach kurzem Mischen bei 25°C inkubiert. Nach 5 min wird die Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ l 35 %iger Essigsäure gestoppt und die Extinktion bei 405 nm (gegen 630 nm) gemessen. Die nach Reaktionsende gemessene Extinktion ist proportional der Enzymaktivität.

Als Maß der relativen Wirksamkeit wird als IC<sub>50</sub> die Konzentration einer Prüfsubstanz in mol/l berechnet, die die Enzymaktivität um 50 % vermindert.

Analog zu Thrombin wird auch die Wirkung auf die amidolytische Aktivität von anderen Serinproteasen

20	Trypsin (0,1 mg/l)	mit S-2222 (0,1 mmol/l)
	Chymotrypsin (0,2 mg/l)	mit S-2586 (0,1 mmol/l)
	Plasmin (0,04 CU/ml)	mit S-2251 (0,1 mmol/l)
	Faktor Xa (0,2 nkat/ml)	mit S-2765 (0,1 mmol/l)
	aktives Protein C	mit S-2366 (0,2 mmol/l)

(jeweils Endkonzentration im Test) untersucht. Die Ergebnisse dieser Tests ermöglichen eine Aussage über die Selektivität der Wirkung von Prüfsubstanzen.

### 30 3. Thrombininduzierte Thrombozytenaggregation in vitro

35 Frisches humanes Citratblut (9 Teile Blut + 1 Teil Natriumcitrat 0,11 mol/l) wird zur Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) und plättchenarmem Plasma (PPP) 16 min bei 250 xg bzw. 20 min bei 3670 xg zentrifugiert.

40 Zur Bestimmung der Thrombozytenaggregation werden 445  $\mu$ l PRP mit 5  $\mu$ l Lösungsmittel (Kontrolle) bzw. Prüfsubstanz versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird der Ansatz 3 min bei 37°C in einem Aggregometer (ELVI 840) inkubiert und 4 min bei 1000 RPM gerührt. Die Aggregation wird durch Zugabe von 50  $\mu$ l Thrombinlösung (Endkonzentration

im Ansatz: 0,15 IU/ml) gestartet. Die Thrombozytenaggregation wird über die Änderung der gemessenen Transmission pro Zeiteinheit in der Probe bestimmt (Slope-Methode).

Als Maß der relativen Wirksamkeit wird als IC<sub>50</sub> die Konzentration einer Prüfsubstanz in mol/l berechnet, die die Thrombozytenaggregation um 50 % hemmt.

#### 4. Antithrombotische Wirkung am arteriovenösen Shunt an der Ratte

In diesem Experiment dient eine Glaskapillare in einem arteriovenösen Shunt als künstliche thrombogene Oberfläche und löst eine Thrombose aus.

Die narkotisierte (Urethan 25 %, 2 x 8 mg/kg i.p.) Ratte wird in Rückenlage auf einer temperierten (37°C) Wärmebank fixiert. In die freipräparierte rechte A. carotis und V. jugularis werden kurze Polyethylen-Katheter (Portex, PE 50) implantiert, mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllt und durch Klemmen verschlossen. Die freien Enden der Katheder werden durch eine 20 mm lange Glaskapillare (Innendurchmesser 1,0 mm) verbunden, die als thrombogene Oberfläche wirkt.

Die Applikation der Prüfsubstanz kann i.v., s.c., p.o. oder als Infusion erfolgen. Nach der gewünschten Inkubationszeit (5, 60 oder 360 min) mit der Prüfsubstanz oder Lösungsmittel (Kontrolle) wird der Shunt durch Entfernen der Klemmen geöffnet. Der Blutstrom durch den Shunt führt zu einem schnellen Anstieg der Shunt-Temperatur, die an der Mitte der Glaskapillare gemessen wird. Die Erhöhung von Raumtemperatur auf Körpertemperatur ist ein Indikator für die Durchgängigkeit des Shunts. Die Temperatur wird bis zum Verschluss des Shunts längstens jedoch 30 min kontinuierlich aufgezeichnet.

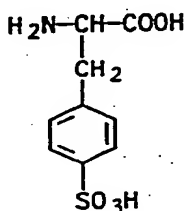
Bei Öffnung des Shunts und am Ende des Experiments werden zusätzlich Blutproben zur Bestimmung der anti-FIIa-Aktivität im Plasma entnommen.

Die Versuchsauswertung erfolgt quantitativ. Mit den Werten von log-Dosis und der Zeit (als Differenz der Verschlusszeiten von behandelter Gruppe und Kontrollgruppe) wird eine lineare Regression berechnet. Für den Vergleich der Wirksamkeit unterschiedlicher Testsubstanzen wird aus der Gleichung der Regressionsgeraden der Wert für die ED<sub>15</sub>min (die Dosis, die bezogen auf die Kontrollgruppe zu einer Verlängerung der Verschlusszeit um 15 min führt) berechnet.

Die neuen Verbindungen sind einfach und in hoher Reinheit herzustellen, chemisch stabil, zeigen kein immunogenes Potential und eignen sich zur Behandlung und Prophylaxe thromboembolischer Erkrankungen wie Myokardinfarkt, peripherer arterieller Verschlusskrankheiten, tiefer Venenthrombosen, Lungenembolie sowie zur Verhinderung der Reocclusion nach Wiedereröffnung arterieller und venöser Gefäße. Sie eignen sich ferner zur Beschichtung künstlicher Oberflächen, die mit Blut oder Plasma in Kontakt stehen (z.B. Dialysemembranen).

Die neuen Verbindungen weisen gegenüber bereits beschriebenen, ebenfalls vom Hirudin abgeleiteten Peptiden, wie MD 28050 (Thrombosis and Haemostasis 63 (1990) 208-214; EP 0 372 503), Hirulog-1 (Biochemistry 29 (1990) 7095-7101; WO 91/02750) und P79 (FEBS Letters 282 (1991) 47-52), eine bessere Wirksamkeit auf.

Durch den Einsatz der in der Formel II beschriebenen unnatürlichen Aminosäure mit dem Substituenten WSO<sub>3</sub>H sind beträchtlich wirksamere Peptide synthetisiert worden, als durch den Einsatz der unnatürlichen Aminosäure



in Peptiden sonst analoger Sequenz. Diese Aminosäure war in anderen von Hirudin abgeleiteten Peptiden bereits eingesetzt worden (EP 0 443 598). Die Wirkstärke dieser neuen Verbindungen liegt in der Größenordnung der Wirkstärke des rekombinanten Hirudins.

## Beispiele

## 1. Synthese der Aminosäuren der Formel II

- 5 Die unnatürlichen Aminosäuren der Formel II wurden nach einer in der Literatur beschriebenen Synthese (J. Org. Chem. 53 (1988) 3621-3624; EP 0 354 108) hergestellt.

## 2. Synthese der Peptide der Formel I

10

## 2.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift

15

20

Die Synthese der Peptide der Formel I erfolgte mit Hilfe der Standardmethoden der Festphasenpeptidsynthese an einem halbautomatischen Peptidsynthesizer Modell SP650 der Firma LABORTEC. Mengenverhältnisse und Volumina der eingesetzten Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, dem Benutzer-Manual entsprechend verwendet. Jeder Kupplungs- und Abspaltungsschritt wurde auf Vollständigkeit überprüft und gegebenenfalls wiederholt.

## 2.1.1 Typischer Synthesecyclus für die Boc-Schutzgruppentechnik:

25

30

35

1. Trifluoroessigsäure und Anisol in DCM 1 x 5 min  
(480:20:500)
2. wie 1. 1 x 15 min
3. Waschen mit DCM 3 x 5 min
4. Diisopropylamin in DCM (100:900) 3 x 3 min
5. Waschen mit DCM 3 x 5 min
6. Kupplung: 1,5 eq Aminosäure, 1,5 eq 0,5 M TBTU in DMF, 1,5 eq 0,5 M Diisopropyl-ethylamin in DCM 1 x 3 min
7. Waschen mit DCM 3 x 5 min
8. bei unvollständigem Umsatz Wiederholung der Kupplung (d.h. zurück zu 6.) oder Capping.
9. zurück zu 1.

### 2.1.2 Typischer Synthesecyclus für die Fmoc-Schutzgruppentechnik

- |    |  |            |
|----|--|------------|
|    | 1. Piperidin in DMF (200:800)  | 1 x 5 min  |
|    | 2. wie 1.  | 1 x 15 min |
| 5  | 3. Waschen mit DMF   | 2 x 5 min  |
|    | 4. Waschen mit DCM   | 2 x 5 min  |
|    | 5. Kupplung wie unter 2.1.1. beschrieben   | 1 x 10 min |
|    | 6. Waschen mit DCM   | 2 x 5 min  |
|    | 7. Waschen mit DMF   | 2 x 5 min  |
| 10 | 8. bei unvollständigem Umsatz Wiederholung der Kupplung (d.h. zurück zu 5.) oder Capping |            |
|    | 9. zurück zu 1.  |            |

### 2.1.3 Aufarbeitung der nach 2.1.1. erhaltenen Peptidharze

15

Das nach 2.1.1. erhaltene Peptidharz wurde im Vakuum getrocknet und in ein Reaktionsgefäß einer TEFLON-HF-Apparatur (Fa. PENINSULA) transferiert. Nach Zugabe eines Scavengers, vorzugsweise Anisol (1 ml/g Harz) wurde unter Kühlung mit flüssigem N<sub>2</sub> Fluorwasserstoff einkondensiert (10 ml/g Harz). Man ließ die Mischung sich auf 0°C erwärmen und rührte 45 min bei dieser Temperatur. Anschließend wurde der Fluorwasserstoff im Vakuum abgezogen und der Rückstand mit Essigester gewaschen, um restlichen Scavenger zu entfernen. Das Peptid wurde mit 30 %iger Essigsäure extrahiert, filtriert und das Filtrat lyophilisiert.

25

### 2.1.4 Aufarbeitung der nach 2.1.2 erhaltenen Peptidharze

30

Das gemäß 2.1.2. erhaltene Peptidharz wurde im Vakuum getrocknet und anschließend in Abhängigkeit von der Aminosäurezusammensetzung einer der folgenden Spaltungsprozeduren unterworfen (Wade, Tregear, Howard Florey Fmoc-Workshop Manual, Melbourne 1985).

35

	Das Peptid enthielt			Spaltbedingungen		Reaktions- zeit
	Arg(Mtr)	Met	Trp	TFA	Scavenger	
5	nein	nein	nein	95 %	5 % H <sub>2</sub>	1,5 h
	ja	nein	nein	95 %	5 % Thianisol	3 h
	nein	ja	nein	95 %	5 % Ethylmethyl- sulfid	1,5 h
10	nein	nein	ja	95 %	5 % Ethandithiol/ Anisol (1:3)	1,5 h
	nein	ja	ja	95 %	5 % Ethandithiol/ Anisol/Ethyl- methylsulfid (1:3:1)	1,5 h
15	ja	ja	ja	93 %	7 % Ethandithiol/ Anisol/ Ethylmethyl- sulfid (1:3:3)	3 h

- 20 Die Suspension des Peptidharzes in der geeigneten TFA-Mischung wurde bei Raumtemperatur für die angegebene Zeit gerührt, danach wurde das Harz abfiltriert und mit TFA sowie DCM gewaschen. Das Filtrat und die Waschlösungen wurden weitgehend eingeeengt und das Peptid durch Zugabe
- 25 von Diethylether ausgefällt. Nach Abkühlung im Eisbad wurde der Niederschlag abfiltriert, in 30 % Essigsäure aufgenommen und lyophilisiert.

#### 2.1.5 Reinigung und Charakterisierung der Peptide

- 30 Die Qualität der Rohpeptide wie auch der gereinigten Peptide wurde mit Hilfe der HPLC beurteilt; die Reinigung wurde mit MPLC oder einer Kombination aus Gelchromatographie und MPLC vorgenommen.

- 35 HPLC:  
Gerät: HP 1090 Liquid Chromatograph  
Stationäre Phase: 100 x 2,1 mm VYDAC C18 (TPB 218); 5 µm;  
300 Å
- 40 Mobile Phase: (A) 0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O; (B) 0,1 % TFA in CH<sub>3</sub>CN;  
Fluß: 0,2 ml/min; Temp. 40°C



## Gradienten:

(a): ab 0 % (B) mit 0,5 % min<sup>-1</sup>(b): ab 5 % (B) mit 1,0 % min<sup>-1</sup>(c): ab 35 % (B) mit 1,0 % min<sup>-1</sup>

5 Probenaufgabe: 3 µl; etwa 0,03 %ige Lösung im Eluenten  
 Detektion: 205 nm

## MPLC:

## Gerät:

10 Labomatic-Gradienten-Mitteldruckchromatographie-Station

Stationäre Phase: 26 x 450 mm bis 37 x 450 mm Eurosil

Bioselect 100/30 C 18; 20 - 45 µm; 100 Å

Mobile Phase: (A) 0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O; (B) CH<sub>3</sub>CN

15 Gradient: Stufengradient mit 0,25 % min<sup>-1</sup> während der  
 Elutionsphase

Detektion: 205 bis 220 nm

## Gelchromatographie:

Stationäre Phasen: SEPHADEX® G-10 bzw. -LH20

20 Mobile Phasen: 10 % AcOH bzw. MeOH

Detektion: UV- und RI-Detektoren in Serie geschaltet.

25 Zur Charakterisierung der gereinigten Peptide wurden  
 Aminosäureanalyse (AAA), Fast-Atom-Bombardment-Massen-  
 spektrometrie (FAB-MS) und gelegentlich Sequencing (SQ)  
 oder NMR-Spektroskopie (NMR) herangezogen.

## 2.2 Spezielle Arbeitsvorschriften

30 2.2.1 [p-Sulfo-Phe<sup>63</sup>]-Nα-acetyl-hirudin<sub>56-65</sub>

1,00 g (0,47 meq) Boc-Gln-Pam-Harz wurden gemäß 2.1.1  
 umgesetzt mit:

35 Boc-Leu-OH

Boc-Ile-OH

Boc-(p-Sulfo)Phe-OH

Boc-Glu(OChx)-OH

Boc-Glu(OChx)-OH

Boc-Glu(OChx)-OH

Boc-Glu(OChx)-OH

Boc-Phe-OH

Boc-Pro-OH

40

Nach der N-Acetylierung mit Acetanhydrid wurde gemäß 2.1.3  
 aufgearbeitet:

Rohausbeute: 305 mg Lyophilisat

Das Rohpeptid wurde gemäß 2.1.5 durch MPLC gereinigt.

HPLC-Retentionszeit (Gradient b): 19,5 min; AAA: stimmt;  
FAB-MS: 1402

5

2.2.2 [D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>]-N<sup>α</sup>-Acetyl-Hirudin<sub>56-65</sub> und  
[L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>]-N<sup>α</sup>-Acetyl-Hirudin<sub>56-65</sub>

10

2,0 g (1,54 meq) Boc-Gln-Pam-Harz wurde gemäß 2.1.1  
umgesetzt mit:

15

Boc-Leu-OH	Boc-Ile-OH
Boc-D, L-(p-Sulfomethyl)Phe-OH	Boc-Glu(OChx)-OH
Boc-Glu(OChx)-OH	Boc-Glu(OChx)-OH
Boc-Glu(OChx)-OH	Boc-Phe-OH
Boc-Pro-OH	

20

Nach der N-Acetylierung mit Acetanhydrid wurde gemäß 2.1.3  
aufgearbeitet:

Rohausbeute: 304 mg Lyophilisat

25

Das Rohpeptid wurde gemäß 2.1.5 durch MPLC gereinigt,  
wobei sich die beiden Diastereomeren trennen ließen.

HPLC-Retentionszeiten (Gradient b): 18,5 und 19,5 min;  
AAA: stimmt; FAB-MS: 1416 und 1416

30

Analog ließen sich [D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>]-N<sup>α</sup>-acetyl-  
hirudin<sub>56-65</sub> und [L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>]-N<sup>α</sup>-acetyl-  
hirudin<sub>56-65</sub> [HPLC-Retentionszeiten (Gradient b): 19,5 und  
21,0 min; AAA: stimmt; FAB-MS: 1418 und 1418] darstellen.

35

2.2.3 [D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub> und  
[L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>

2,0 g (1,54 meq) Boc-Gln-Pam-Harz wurden gemäß 2.1.1  
umgesetzt mit:

40

Boc-Leu-OH	Boc-Ile-OH
Boc-D, L-(p-Sulfomethyl)Phe-OH	Boc-Glu(OChx)-OH
Boc-Glu(OChx)-OH	Boc-Glu(OChx)-OH
Boc-Glu(OChx)-OH	Boc-Phe-OH
Boc-Pro-OH	

Nach der N-Succinylierung mit Bernsteinsäureanhydrid wurde gemäß 2.1.3 aufgearbeitet:

Rohausbeute: 364 mg Lyophilisat

5

Das Rohpeptid wurde gemäß 2.1.5 durch MPLC gereinigt.

HPLC-Retentionszeit (Gradient b): 18,5 min und 20,0 min;  
AAA: stimmt; FAB-MS: 1474 und 1474

10

Analog ließen sich darstellen:

[p-Sulfo-Phe<sup>63</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>

15

HPLC-Retentionszeit (Gradient b): 23,0 min; AAA: stimmt;  
FAB-MS: 1460

[Hyp<sup>60</sup>, p-Sulfo-Phe<sup>63</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>

HPLC-Retentionszeit (Gradient b): 20,0 min; AAA: stimmt;  
FAB-MS: 1476

20

[Hyp<sup>60</sup>, p-Sulfo-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>

HPLC-Retentionszeit (Gradient b): 25,0 min; AAA: stimmt;  
FAB-MS: 1516

25

[Tyr<sup>56</sup>, D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub> und

[Tyr<sup>56</sup>, L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>

30

HPLC-Retentionszeit (Gradient b): 23,0 min und 26,5 min;  
AAA: stimmt; FAB-MS: 1530 und 1530

[Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub> und

35

[Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>

HPLC-Retentionszeit (Gradient b): 18,0 min und 19,5 min;  
AAA: stimmt; FAB-MS: 1498 und 1498

40

- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub> und  
[Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- 5 HPLC-Retentionszeit (Gradient b): 19,0 min und 20,0 min;  
AAA: stimmt; FAB-MS: 1514 und 1514
- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>, Glu<sup>65</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub> und  
10 [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>, Glu<sup>65</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>  
HPLC-Retentionszeit (Gradient b): 20,0 min und 23,0 min;  
AAA: stimmt; FAB-MS: 1515 und 1515
- 15 Bei Einsatz von Racematen der Aminosäuren der Formel II in die Peptidsynthese wurden die resultierenden diastereomeren Peptidgemische mit Hilfe der MPLC getrennt. In der Regel zeigte dabei das diastereomere Peptid mit der  
20 größeren HPLC-Retentionszeit eine um zwei Größenordnungen bessere Wirkstärke als das Diastereomere mit der kleineren HPLC-Retentionszeit. Eine Zuordnung bezüglich der jeweils enthaltenden Enantiomeren der unnatürlichen Aminosäure der Formel II konnte bisher noch nicht erfolgen.
- 25 2.3 Weitere Beispiele für Peptide der Formel I
- Wie unter Punkt 2.2 beschrieben, können folgende Peptide der Formel I synthetisiert werden:
- 30 [D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>  
[L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>  
[Hyp<sup>60</sup>, D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>  
[Hyp<sup>60</sup>, L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>  
[Hyp<sup>60</sup>, D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-  
35 hirudin<sub>56-65</sub>  
[Hyp<sup>60</sup>, L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>  
[Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>  
40 [Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>

- [Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- 5 [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Val<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Val<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- 10 [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Cha<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Ile<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Cha<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Ile<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-64</sub>
- 15 [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-64</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>, D-Gln<sup>65</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>, D-Gln<sup>65</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- 20 [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>, D-Glu<sup>65</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>, D-Glu<sup>65</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- 25 [Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>58</sup>, Val<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>58</sup>, Val<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>58</sup>, Cha<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Ile<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- 30 [Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>58</sup>, Cha<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Sulfomethyl-Phe<sup>63</sup>, Ile<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- 35 [D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- 40 [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>

- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Hyp<sup>60</sup>, D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Hyp<sup>60</sup>, L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- 5 [Hyp<sup>60</sup>, D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Hyp<sup>60</sup>, L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- 10 [Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- 15 [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- 20 [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Val<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Val<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- 25 [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Cha<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Ile<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Cha<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Ile<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-64</sub>
- 30 [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-64</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>, D-Gln<sup>65</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- 35 [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>, D-Gln<sup>65</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>, Glu<sup>65</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- [Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>, Glu<sup>65</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>
- 40

[Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>,  
D-Glu<sup>65</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>  
[Tyr<sup>56</sup>, Pro<sup>58</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>,  
D-Glu<sup>65</sup>]-N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>  
5 [Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>58</sup>, Val<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-  
N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>  
[Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>58</sup>, Val<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Cha<sup>64</sup>]-  
N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>  
10 [Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>58</sup>, Cha<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, D-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Ile<sup>64</sup>]-  
N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>  
[Tyr<sup>56</sup>, Hyp<sup>58</sup>, Cha<sup>59</sup>, Hyp<sup>60</sup>, L-p-Phosphonomethyl-Phe<sup>63</sup>, Ile<sup>64</sup>]-  
N<sup>α</sup>-succinyl-hirudin<sub>56-65</sub>

15

20

25

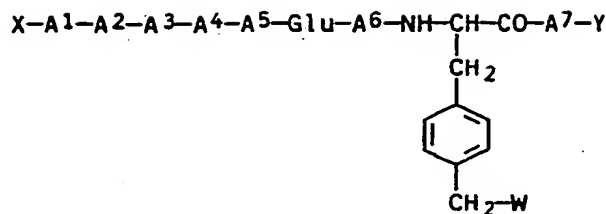
30

35

40

## Patentansprüche

## 1. Peptide der Formel I



I,

5 worin

X H, Acetyl, Succinyl, Maleoyl, Phthaloyl oder Fumaryl,

A<sup>1</sup> Phe, Tyr oder Cha,

10

A<sup>2</sup> Glu oder D-Glu,A<sup>3</sup> Glu, Pro oder Hyp,

15

A<sup>4</sup> Ile, Leu, Val oder Cha,A<sup>5</sup> Pro oder Hyp,A<sup>6</sup> Glu oder D-Glu,

20

A<sup>7</sup> Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Cha oder D-Cha,Y OH, Gln-OH, Gln-NH<sub>2</sub>, D-Gln-OH, D-Gln-NH<sub>2</sub>, Glu-OH, Glu-NH<sub>2</sub>,  
D-Glu-OH oder D-Glu-NH<sub>2</sub> und

25

W für einen der Reste SO<sub>3</sub>H oder PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> steht,sowie deren Salze mit physiologisch verträglichen Basen oder  
Säuren.

30



2. Verfahren zur Herstellung der Peptide der Formel I gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man diese nach in der Peptidchemie bekannten Methoden herstellt.
- 5 3. Peptide der Formel I gemäß Anspruch 1 zur Verwendung bei der Bekämpfung von Krankheiten.

10

15

20

25

30

35

40

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 91/02191

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) \*

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl.5 C07K7/06 //A61K37/64

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched \*

Classification System |

Classification Symbols

Int.Cl.5 A 61K; C07K

Documentation Searched other than Minimum Documentation  
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched \*

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT \*

Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
P,A	EP, A2 0443598 (BEHRINGWERKE) 28 August 1991 see the whole document	1-3
P,A	EP, A1, 0443429 (MERRELL DOW PHARMACEUTICALS INC.) 28 August 1991 see the whole document	1-3
A	WO, A1, 9101328 (BIOGEN, INC.) 7 February 1991, see the whole document	1-3
A	WO, A1, 9003391 (BIOGEN, INC.) 5 April 1990 see the whole document	1-3
A	EP, A2, 0372670 (BIOGEN, INC. ET AL) 13 June 1990 see the whole document	1-3

\* Special categories of cited documents: <sup>10</sup>

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Δ" document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

17 February 1992 (17.02.92)

Date of Mailing of this International Search Report

18 March 1992 (18.03.92)

International Searching Authority

Signature of Authorized Officer

EUROPEAN PATENT OFFICE

# ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. PCT/EP 91/02191

SA 53244

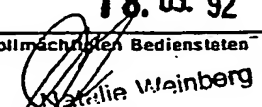
This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 30/12/91. The European Patent office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A2- 0443598	28/08/91	AU-D- 7125591 DE-A- 4005591	29/08/91 05/09/91
EP-A1- 0443429	28/08/91	AU-D- 7089091	15/08/91
WO-A1- 9101328	07/02/91	AU-D- 6054090 AU-D- 6070590 WO-A- 91/01142	22/02/91 22/02/91 07/02/91
WO-A1- 9003391	05/04/90	AU-D- 3098289 EP-A- 0333356	07/09/89 20/09/89
EP-A2- 0372670	13/06/90	AU-D- 3098189 WO-A- 90/06128	07/06/90 14/06/90

For more details about this annex : see Official Journal of the European patent Office, No. 12/82

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 91/02191

<b>I. KLASSEIFIKATION DES ANMELDUNGSGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Cl. <sup>5</sup> C 07 K 7/06 // A 61 K 37/64		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Cl. <sup>5</sup>	A 61 K; C 07 K	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN</b> <sup>9</sup>		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Beitr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
P, A	EP, A2, 0443598 (BEHRINGWERKE) 28 August 1991, siehe Dokument insgesamt  --	1-3
P, A	EP, A1, 0443429 (MERRELL DOW PHARMACEUTICALS INC.) 28 August 1991, siehe Dokument insgesamt  --	1-3
A	WO, A1, 9101328 (BIOGEN, INC.) 7 Februar 1991, siehe Dokument insgesamt  --	1-3
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
17. Februar 1992		18.03.92
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten
Europäisches Patentamt		 Natalia Weinberg

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		Betr. Anspruch Nr.
Art	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	
A	WO, A1, 9003391 (BIOGEN, INC.) 5 April 1990; siehe Dokument insgesamt	1-3
A	EP, A2, 0372670 (BIOGEN, INC. ET AL) 13 Juni 1990, siehe Dokument insgesamt	1-3

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.PCT/EP 91/02191**

SA 53244

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 30/12/91  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A2- 0443598	28/08/91	AU-D- 7125591 DE-A- 4005591	29/08/91 05/09/91
EP-A1- 0443429	28/08/91	AU-D- 7089091	15/08/91
WO-A1- 9101328	07/02/91	AU-D- 6054090 AU-D- 6070590 WO-A- 91/01142	22/02/91 22/02/91 07/02/91
WO-A1- 9003391	05/04/90	AU-D- 3098289 EP-A- 0333356	07/09/89 20/09/89
EP-A2- 0372670	13/06/90	AU-D- 3098189 WO-A- 90/06128	07/06/90 14/06/90

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82